

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：82112

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25871108

研究課題名(和文) オクタン酸はGタンパク質共役型受容体を介してブタ脂肪細胞分化を引き起こすか？

研究課題名(英文) Identification and functional analysis of G-protein-coupled receptors in the differentiation of porcine subcutaneous preadipocytes

研究代表者

谷口 雅章 (Taniguchi, Masaaki)

独立行政法人農業生物資源研究所・家畜ゲノム研究ユニット・主任研究員

研究者番号：60531431

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Gタンパク共役型受容体(GPCR)は細胞外の刺激を細胞内に伝えることで様々な生理機能に関わる。本研究はブタ脂肪細胞分化(未成熟から成熟脂肪細胞への変化)に関わるGPCRの機能を検討した。ブタ脂肪前駆細胞で10種類のGPCR遺伝子を同定した。そのうち3種類のGPCR遺伝子ノックダウン(遺伝子機能の不全)は、脂質合成のカギを握るPPAR(ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体)経路の働きを弱める一方で、細胞増殖を上昇させることを明らかにした。本研究で同定したブタGPCR遺伝子は、脂質合成および細胞の増殖性に関わる分子経路を制御することで、脂質合成量の調節に寄与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：G-protein-coupled receptors (GPCRs) are membrane proteins that enable cells to sense molecular signals and to respond in a broad range of biological processes according to the circumstances of cells. Firstly we detected 10 candidate GPCR genes expressed in porcine subcutaneous preadipocytes (PSPA). Gene knockdown for three out of ten genes obviously decreased the differentiation of the PSPA. Therefore we investigated gene expression profiles of PSPA transfected with siRNA for each of three GPCR genes. Gene ontology analysis elucidated that the knockdown of GPCR genes up-regulated molecular pathways related to skeletal system development, mitosis, and cell adhesion, respectively. Interestingly, knockdown of all three genes commonly down-regulated genes categorized in PPAR signaling pathway and immune response. Differentiation of PSPA might be attributable to the alteration of gene expression profiles regulated by GPCRs identified in this study.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：Gタンパク質共役型受容体 脂肪細胞 脂肪酸 バイオマーカー ブタ 分化誘導

1. 研究開始当初の背景

Gタンパク質共役型受容体 (GPCR) は、多様なリガンドを検知する細胞膜上のセンサー分子として細胞内シグナル伝達の制御に関わり、様々な細胞の生理機能発現に寄与している。近年、遊離脂肪酸をリガンドとする GPCR が同定され、脂肪細胞の分化や脂質代謝に関わることが明らかとなった。一方、ブタ皮下脂肪前駆細胞 (Porcine Subcutaneous Pre-Adipocyte: PSPA) の分化誘導においては、オクタン酸が必須であるが、その作用機序は明らかとなっていなかった。またブタの脂肪細胞における GPCR に関する知見も得られていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、まず未分化 PSPA において発現する GPCR 遺伝子の同定を行った。ついで遺伝子ノックダウン法により、GPCR 遺伝子の機能が欠損した際の PSPA における脂肪細胞分化および脂質合成の変動を検討した。さらに網羅的遺伝子発現量解析により、GPCR 遺伝子ノックダウンにより影響を受けたパスウェイの解析を行った。

3. 研究の方法

PSPA で発現する GPCR 遺伝子の同定は次世代シーケンサーGS-FLX (Roche 社) に基づく RNA-seq 法により、網羅的な mRNA 配列の解析することで行った。次に Gene ontology 解析により GPCR 活性を持つ遺伝子を抽出した。該当する GPCR 候補遺伝子の完全長 cDNA 配列を決定し、それに基づいて RNA 抑制のための siRNA (short-interference RNA) を設計した。PSPA に対して siRNA をトランスフェクトした後、分化誘導をかけ、脂肪細胞分化の程度を検討した。網羅的な遺伝子発現量解析のためにブタ特異的 4 万 4 千プローブを搭載したカスタムマイクロアレイ (Agilent 社) を用いた。

4. 研究成果

本研究で同定した PSPA で発現する遺伝子数は重複を除くと 4862 個であった。そのうち GPCR 活性に関わる遺伝子は 12 種類と推定された。実際に PSPA での完全長 cDNA 配列が確認されたのは 10 種類であった。そこで全 10 種類の GPCR 候補遺伝子に対して設計した siRNA を個別に PSPA にトランスフェクトして、脂肪細胞分化に対する効果を検討した。その結果、3 種類の GPCR 遺伝子 (GPCR-A、GPCR-B および GPCR-C) に関して、脂肪細胞分化の分子マーカである PPAR 遺伝子発現量の減少、および、トリグリセライド合成量の減少が観察された (図 1)。次に、3 種類の GPCR 遺伝子をノックダウンした際に発現量が変動する遺伝子を網羅的に解析するため、マイクロアレイ遺伝子発現量解析を行った。脂質合成に重要な役割を持つ PPAR や免疫機能に関連する遺伝子群の発現

量が減少することが明らかとなった。また細胞増殖や細胞接着に関わる遺伝子群の発現量が上昇することが明らかとなった (図 2)。本研究で同定したブタ GPCR 遺伝子は、脂質合成および細胞の増殖性に関わる分子経路を制御することで、脂質合成量の調節に寄与することが示唆された。

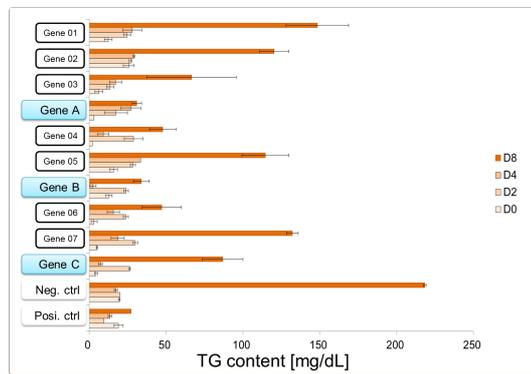
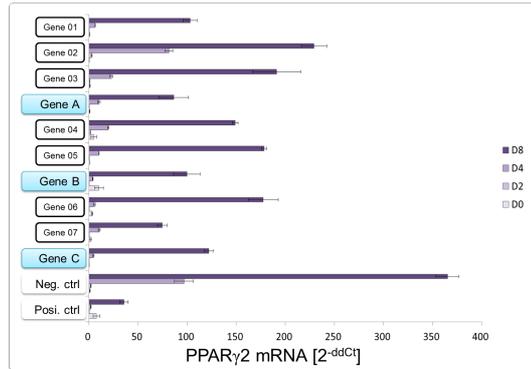
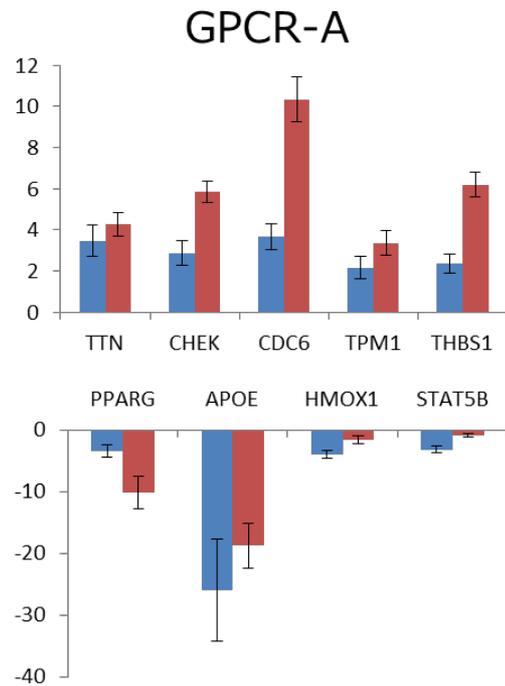


図 1 GPCR 遺伝子ノックダウンによる脂肪細胞分化マーカー遺伝子 PPAR (上)と脂質合成量 (下)の減少



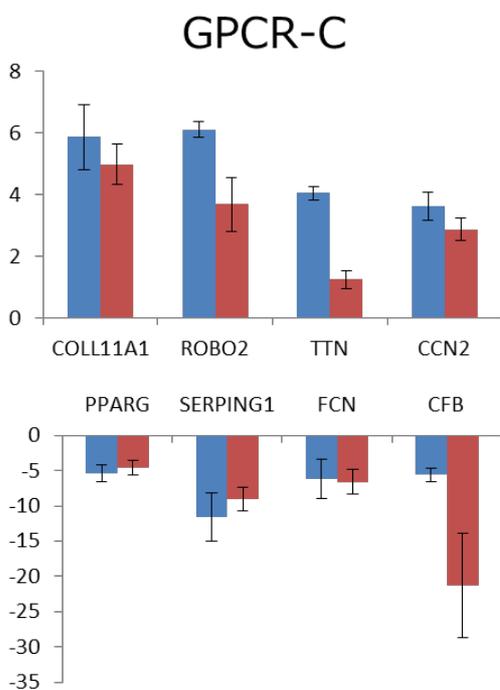
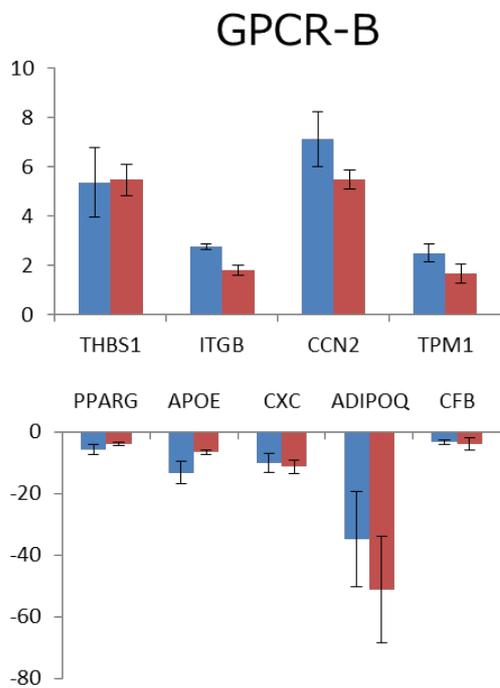


図2 GPCR 遺伝子ノックダウンにより発現量が変動した遺伝子  
 (GPCR-A 上)細胞周期に関わる遺伝子発現量が上昇。(GPCR-A 下) PPAR シグナリングに関する遺伝子発現量が低下。(GPCR-B 上)細胞接着およびシグナリングに関する遺伝子発現量が上昇。(GPCR-B 下) PPAR シグナリングおよび免疫系の遺伝子発現量が低下。(GPCR-C 上)細胞接着に関する遺伝子発現量が上昇。(GPCR-C 下) PPAR シグナリングおよび免疫系の遺伝子発現量が低下。

## 5. 主な発表論文等 (研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

Masaaki Taniguchi, Hirohide Uenishi<sup>1</sup>, Satoshi Mikawa.

Identification and gene expression analysis of G-protein-coupled receptors in the differentiation of Porcine Subcutaneous Pre-Adipocytes (PSPA) 第 36 回 日本分子生物学会年会 2013 年 12 月 3 日(火)~6 日(金)神戸国際会議場・神戸国際展示場・神戸ポートピアホテル

Masaaki Taniguchi, Hirohide Uenishi<sup>1</sup>, Satoshi Mikawa.

Gene knockdown of G-protein-coupled receptors decreased differentiation of Porcine Subcutaneous Pre-Adipocytes 第 37 回 日本分子生物学会年会 2014 年 11 月 25 日(火)~27 日(木)パシフィコ横浜

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕  
 出願状況(計 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年月日：  
 国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年月日：  
 取得年月日：  
 国内外の別：

〔その他〕  
 ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究代表者 ( )

研究者番号：

(2)研究分担者 ( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：